

13/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003477545

WPI Acc No: 1982-25508E/198213

**Coenzyme-Q 10 preparation - by cultivating microorganism of the genus  
Methylobacterium in medium contg. carbon source, vitamin(s), inorganic  
cpds. etc.**

Patent Assignee: MITSUBISHI GAS CHEM IND CO LTD (MITN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 57033599	A	19820223				198213 B
JP 82038240	B	19820814				198236

Priority Applications (No Type Date): JP 80107994 A 19800806

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 57033599	A		4		

Abstract (Basic): JP 57033599 A

Microorganism belonging to the genus Methylobacgerium is  
cultivated

to produce co-enzyme Q10 which is recovered from the culture  
medium.

Co-enzyme Q10 can be obtd. in large amts. by simple cultivation.  
Pref.

microorganisms include Methylobacterium organophilum ATCC 27886,  
ATCC  
29983, etc.

The culture medium contains carbonsource such as peptone,  
glucose,

fructose, propanol, methanol, methylamine, trimethylamine, acetic  
acid,

formic acid, succinic acid, etc., nitrogen source such as ammonium  
sulphate, urea, casein, yeast, etc. inorganic cpd. such as Ca, Mg,

K,  
salts etc. and other additives such as vitamins, amino acids, etc.

The  
cultivation is conducted at 20-45 (25-38) deg.C at pH 5-10, (6.0-  
7.5)

under aerobic conditions. The co-enzyme Q10 is recovered by  
centrifugation, extn., etc.

Title Terms: COENZYME-Q; PREPARATION; CULTIVATE; MICROORGANISM; GENUS;  
MEDIUM; CONTAIN; CARBON; SOURCE; VITAMIN; INORGANIC; COMPOUND

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12P-007/66; C12R-001/01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02B; B04-B02C1; D05-C03; D05-H01; D05-H04

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* G018 G100 H5 H542 H7 H723 H8 K0 L9 L951 M210 M211 M226 M231 M232  
M240 M272 M282 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M720 M903 N131 N512  
N513 Q232 V0 V801

?

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—33599

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和57年(1982)2月23日

C 12 P 7/66  
// (C 12 P 7/66  
C 12 R 1/01 )

6760—4B

発明の数 1  
審査請求 有

(全 4 頁)

⑮ 助酵素 Q<sub>10</sub> の製造法

新潟市小金町 1—228

⑯ 特 願 昭55—107994

⑰ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社

⑱ 出 願 昭55(1980)8月6日

東京都千代田区丸の内2丁目5  
番2号

⑲ 発 明 者 浦上貞治

明 細 書

1. 発明の名称

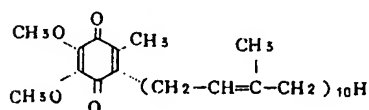
助酵素 Q<sub>10</sub> の製造法

2. 特許請求の範囲

メチロバクテリウム属に属する助酵素 Q<sub>10</sub> 生産細菌を培養して菌体を得、該菌体から助酵素 Q<sub>10</sub> を採取することを特徴とする助酵素 Q<sub>10</sub> の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、細菌による助酵素 Q<sub>10</sub> の製造法に関する。助酵素 Q<sub>10</sub> は下に示される構造式を有し、生体内の末端呼吸系の電子伝達体として重要な役割を果し、解機能亢進剤、重症筋無力症治療剤、肺気腫治療剤、再生不良性貧血治療剤および円形脱毛症治療剤などの医薬品ならびに飼料添加剤などとして有用な化合物である。



従来、助酵素 Q<sub>10</sub> は、動物または植物の組織から抽出しさらに精製することにより製造されている。しかしながら、この方法は原料が高価なうえ、大規模に生産することは困難であり、経済的かつ安定的に生産することは、不可能に近い。

本発明者は、助酵素 Q<sub>10</sub> を経済的かつ大規模に生産する方法について鋭意研究を重ねた結果、大規模に培養することが可能なメチロバクテリウム オルガノフィラム (Methylobacterium organophilum) A T C C 27886 (A T C C 46 は、ジ アメリカン・タイプ カルチャコレクション — The American Type Culture Collection — に保存されている菌株の番号を示す) が助酵素 Q<sub>10</sub> を含むことを見出し、本発明を完成した。

本発明は、助酵素 Q<sub>10</sub> を大規模に、しかも経済的かつ安定的に生産する方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、メチロバクテリウム属

に属する助酵素 $Q_{10}$ 生産菌を培養して菌体を得、該菌体から助酵素 $Q_{10}$ を採取することを特徴とする助酵素 $Q_{10}$ の製造法である。

本発明に用いられる細菌は、メチロバクテリウム属に属し、助酵素 $Q_{10}$ を生産する菌株であれば、いずれの菌株でもよく、たとえば前記のメチロバクテリウム オルガノフィラム ATCC 29983 などがある。

培養に使用する培地としては、特に制限はなく、これら助酵素 $Q_{10}$ 生産細菌が生育および増殖しうる培地であれば、天然培地および合成培地のいずれでも良い。

炭素源としては、これら細菌が利用できる炭素源ならいずれでも良く、たとえば糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物あるいはグルコースおよびフラクトースなどの糖類、エタノール、メタノールおよび1-プロパノールなどのアルコール類、メチルアミン、ジメチルアミンおよびトリメチルアミンなどのメチルアミン類、ならびに酢酸、ギ酸、ピルビン酸、コハク

酸およびオキザロ酸の有機酸などがある。炭素源以外の培地成分としては、通常使用されている物質を使用できる。窒素源としては硫酸および塩安などのアンモニウム塩、ならびに尿素、コーン・ステイブ・リカー、カゼイン、ペプトンおよび酵母エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。その他、無機化合物としては、たとえばカルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、モリブデン塩、コバルト塩、ホウ素化合物およびヨウ素化合物などが用いられる。さらに、ビタミン類およびアミノ酸などの生育に必須な物質あるいは、生長促進物質を添加することが好ましい。

培養温度は通常は20～45℃、実用上好ましくは25～38℃の範囲で各菌株の生育、増殖に好適な温度を選択すればよい。培養pHは、通常はpH 5～10、実用上好ましくはpH 6.0～7.5の範囲で各菌株にとって生育、増殖に適したpHを選択する。

培養方式は、回分培養あるいは連続培養のいずれでもよい。

微生物菌体を好氣的に培養するには、一般に酸素を必要とするが菌の生育速度および代謝物収率などの点から培養液中の溶存酸素濃度を0.05 ppm以上にすることが好ましい。そのためには通気量を多くすること、攪拌の回転数を多くすること、供給ガスとして酸素の利用および培養圧を高くすることなどの方法が採用される。

培地成分として、有機酸あるいはアンモニウム塩、尿素などを使用する場合は菌の増殖に従ってpHの変動が生じる。従つて、培養期間中の培養液のpHを所望の値に保つため、アンモニアおよびカセイソーダなどのアルカリまたは硫酸および有機酸などの酸を補給することが好ましい。

このようにして培養して得られた培養液から、ろ過もしくは遠心分離などの固液分離手段によつて菌体分離し、必要ならば水などで菌体を洗

浄する。

このようにして得られた菌体からの助酵素 $Q_{10}$ の分離抽出は常法に従つて行なうことができる。たとえばエタノールに菌体を懸濁させて50～90℃で1～数時間加熱抽出するかまたはエチルエーテルとエタノールとの混合溶媒を使用して室温で抽出し、さらに必要に応じてn-ヘキサンなどにより純度をあげることもできる。またメタノール・水酸化ナトリウムおよびピロガロールの三者混合物を用いて菌体中のリン脂質などのけん化性物質をけん化し、このけん化液にn-ヘキサンの如き水と混合しない有機溶媒を加えて、このけん化液から助酵素 $Q_{10}$ を抽出する。

ついでこのようにして抽出された粗製物をアルミナ、シリカゲルおよびフロリジルなどをそれぞれ用いて分別精製を行なうかまたは単離する。

菌体から得られた助酵素 $Q_{10}$ の同定には、一般に紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグ

ラファイ、元素分析、融点、赤外および紫外外部吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルならびに質譜分析などの手段がそれぞれ用いられる。また、定量法としては、通常はたとえばレッドファーンの方法〔メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 第10巻、第381頁、1967〕が用いられる。

本発明によつて、助酵素 $\gamma_{10}$ を大規模にしかも経済的かつ安定的に生産することが可能となった。

以下実施例によつてさらに詳しく説明する。

#### 実施例 1

純水 1 ㍉あたり、メタノール 1.0 ㍉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 ㍉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 ㍉、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.1 ㍉、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 ㍉、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  3.0 ㍉、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.0 ㍉、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 ㍉、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5 ㍉、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 ㍉、 $\text{NaCl}$  0.5 ㍉およびビタミン混合液 1 ㍉を溶解し、pH 7.0 に調整した培地 (培地

$\text{H}_3\text{PO}_3$  1.0 ㍉、 $\text{NaCl}$  5.0 ㍉および  $\text{KI}$  1.0 ㍉を含み pH 7.0 に調整した培地 (培地 B) 1.5 ㍉を 30 ㍉容培養槽に入れ、殺菌後、メタノール 3.0 ㍉および種母液 2.0 ㍉を添加した。細菌が増殖するに従つて、培養液中のメタノール濃度が低下したが、それをガスクロマトグラフィーで分析し、培養液のメタノール濃度が 0.05 ~ 0.15 wt% になるように、メタノールを補給した。培養温度 28℃、培養 pH 7.0、攪拌機の回転数 800 回/分および通気量 1 vvm で通気 (空気を使用) 攪拌培養を行なつたところ、世代時間が約 2.5 時間で細菌が増殖した。培養を開始してから 48 時間後に、培養液を遠心分離して、生菌体 400 ㍉ (乾物換算 80 ㍉) を得た。

この生菌体 400 ㍉を 80 ㍉の水に懸濁し、これにメタノール 80 ㍉、ピロガロール 4.0 ㍉および 6.0 ㍉カセイソーダ水溶液 4.0 ㍉を加え、85℃で 1 時間加熱還流した後、3.2 ㍉の水を加えて急冷したのち、n-ヘキサン

A) 3.0 ㍉を 100 ㍉三角フラスコに分注し、120℃で 20 分間殺菌した。培地 A に寒天 2.0 ㍉/㍉を添加したメタノール含有寒天斜面培地で 28℃で 3 日間培養したメチロバクテリウム オルガノフィラム ATCC 27886 の 1 白金耳を、100 ㍉容三角フラスコ中の培地 A 3.0 ㍉に接種し、28℃でロータリー・シェーカーで回転数 220 回/分の回転数を与え 3 日間培養を行なつた。

この培養液 5 ㍉を、1 ㍉容三角フラスコに入れて殺菌した上記培地 A 2.0 ㍉に接種して、28℃で 3 日間ロータリー・シェーカーで回転数 220 回/分の回転振とう培養を行なつた。この培養液を種母液とした。

工業用水 1 ㍉あたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 ㍉、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 ㍉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5 ㍉、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  3.0 ㍉、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9.0 ㍉、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 ㍉、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.5 ㍉、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.5 ㍉、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.0 ㍉、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 ㍉、

1.6 ㍉を加えて抽出し、n-ヘキサン層を 400 ㍉の水で 3 回洗浄した。この n-ヘキサン層から n-ヘキサンを留去した残液に 80 ㍉のアセトンを添加し、予過後、アセトンを留去し、乾燥した。

この乾燥物を n-ヘキサンに再度溶解しアルミナカラムにかけ、はじめ 2 ㍉の、ついで 4 ㍉のエチルエーテルを含む n-ヘキサン溶液を、それぞれ 800 ㍉用いて洗浄したのち、さらに該カラムから 5 ㍉エチルエーテルを含む n-ヘキサン溶液を用いて溶出し、この溶出液中の黄色部分を減圧濃縮して得られた乾固物を 40 ㍉のエタノールに溶解した。この溶解物を冷室に放置して黄色の粗結晶 19.0 ㍉を得た。

この粗結晶にエタノールからの再結晶操作を 2 回繰り返して実施し、9.0 ㍉の黄色板状結晶を得た。

#### 実施例 2

純水 1 ㍉あたりペプトン 5 ㍉、酵母エキス

5 g およびグルコース 5 g を溶解し、pH 7.0 に調整した培地 (培地 C) 30 ml を 100 ml 容三角フラスコに分注し、120℃で20分間殺菌した。培地 C に寒天 20 g/l を添加した寒天斜面培地で28℃で3日間培養した *メチロバクテリウム オルガノフィラム* ATCC 27886 の1白耳を、100 ml 容三角フラスコ中の培地 C 30 ml に接種し、28℃でロータリー・シェーカーで回転数 220 回/分の回転数を与え2日間培養を行なった。

この培養液 5 ml を、1 l 容三角フラスコ中に入れて殺菌した培地 B 200 ml に接種し、28℃で2日間ロータリー・シェーカーで回転数 220 回/分の回転数と培養を行なった。

この培養液を種母液とした。

工業用水 1 l あたりペプトン 10.1 g、酵母エキス 10 g およびグルコース 10 g を含み pH 7.0 に調整した培地 15 l を 30 l 容培養槽に入れ殺菌後、種母液 200 ml を添加した。培養温度 28℃、培養 pH 7.0、

攪拌機の回転数 800 回/分および通気量 1 vvm で、通気 (空気を使用) 攪拌培養を行ない、培養を開始してから36時間後に培養液を遠心分離し、生菌体 250 g (乾物換算 50 g) を得た。

この生菌体 250 g を 500 ml のエタノールに懸濁し、80℃で1時間加熱滅菌した後、1.6 l の水を加え急冷したのち、n-ヘキサン 800 ml を加えて抽出し、n-ヘキサン層を200 ml の水で3回洗浄した。この液から n-ヘキサンを留去した残液に40 ml のアセトンを追加し、析過後、析液からアセトンを留去し、乾燥した。

この乾燥物を実施例1と同様に精製および再結晶して70 mg の黄色板状結晶を得た。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社  
代表者 相川 泰吉